

Docket No.: 61352-054

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of	:	Customer Number: 20277
	:	
Nobuhiko OZAKI, et al.	:	Confirmation Number:
	:	
Serial No.:	:	Group Art Unit:
	:	
Filed: October 28, 2003	:	Examiner:
	:	
For:		ASSEMBLED ELECTRODE AND APPARATUS FOR FIXING CELL EQUIPPED THEREWITH

**CLAIM OF PRIORITY AND
TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT**

Mail Stop CPD
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicants hereby claim the priority of:

Japanese Patent Application No. JP 2002-313005, filed on October 28, 2002.

cited in the Declaration of the present application. A certified copy is submitted herewith.

Respectfully submitted;

MCDERMOTT, WILL & EMERY


Michael E. Fogarty
Registration No. 36,139

600 13th Street, N.W.
Washington, DC 20005-3096
(202) 756-8000 MEF:gav
Facsimile: (202) 756-8087
Date: October 28, 2003

61352-054
Nobuhiko OZAKI, et al.
October 28, 2003

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

McDermott, Will & Emery

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年10月28日

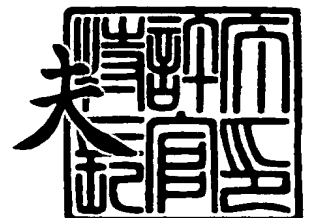
出 願 番 号
Application Number: 特願2002-313005
[ST. 10/C]: [JP2002-313005]

出 願 人
Applicant(s): 松下電器産業株式会社

2003年 8月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2003-3064819

【書類名】 特許願

【整理番号】 2033840171

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 B23K 11/30

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 尾崎 亘彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 岡 弘章

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100065868

【弁理士】

【氏名又は名称】 角田 嘉宏

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100088960

【弁理士】

【氏名又は名称】 高石 ▲さとり▼

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100106242

【弁理士】

【氏名又は名称】 古川 安航

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100110951

【弁理士】

【氏名又は名称】 西谷 俊男

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100114834

【弁理士】

【氏名又は名称】 幅 慶司

【電話番号】 078-321-8822

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006220

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0101410

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 一体型複合電極

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体試料の電気生理的变化に起因する電気信号を検出するための一体型複合電極であって、

基板上に配置された少なくとも一つの電極と、該電極からの電気信号を導出し得る配線部とを備え、

該電極は、その表面が誘電体材料で被覆されていることを特徴とする一体型複合電極。

【請求項 2】 前記生体試料が細胞である請求項 1 に記載の一体型複合電極

。

【請求項 3】 前記誘電体材料が強塩基性官能基もしくは強酸性官能基を持つ高分子材料である請求項 1 に記載の一体型複合電極。

【請求項 4】 前記高分子材料が、ポリエチレンイミン、ポリオルニチン、ポリリジンからなる群から選ばれる正荷電性ポリマーである請求項 3 に記載の一体型複合電極。

【請求項 5】 前記高分子材料が、ビグアニド基、もしくはカルバモイルグアニド基を持つ高分子である請求項 3 に記載の一体型複合電極。

【請求項 6】 前記電極が白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウム、銀、タングステン、ITO およびこれらの組み合わせからなる群から選ばれる素材から形成される請求項 1 に記載の一体型複合電極。

【請求項 7】 前記誘電体材料で被覆された電極の表面に、さらに生体試料の固定化を容易及び／又は強固にする固定化材が被覆されている請求項 1 に記載の一体型複合電極。

【請求項 8】 前記固定化材が細胞接着性のたん白質である請求項 7 に記載の一体型複合電極。

【請求項 9】 前記電極は、0.1 M 電解質溶液との界面の電気二重層容量が、印加電圧 0 V において、 $27 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 以上である請求項 1 に記載の一体型複合電極。

【請求項 10】 前記電極が、基板に形成された貫通孔の孔内に、又は、さらに基板表面における前記貫通孔の孔周囲を包囲するように形成されている請求項 1 に記載の一体型複合電極。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体試料の電気生理的活動に起因する電気信号を測定するための一体型複合電極に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来より、細胞の電気生理的活動を測定する技術が知られている。このような技術は、例えば細胞の電気生理的活動を指標にして薬品をスクリーニングするために用いられる。細胞の電気生理的活動とは、主として細胞のイオンチャネルの活性度をいう。細胞においては、イオンチャネルの活性度に対応するイオン透過性の変化に伴って細胞膜内外のイオン濃度が変化する。したがって、細胞膜電位の変化の測定により、イオンチャネルの開閉時間、タイミング、その回数等、イオンチャネルの活性度（細胞の電氣的活動）の測定が可能である。

【0003】

細胞膜電位の変化を測定する方法として、従来より、ガラス製の細胞外電位測定用電極または金属製（白金など）の電極をマイクロマニピレータなどを用いて細胞近傍に設置することにより測定する方法が知られている。また、別の方法として、同様な電極を細胞内に刺入することにより、細胞内電位の変化を測定する方法が知られている。

【0004】

上記方法によると、細胞のイオンチャネルの活性度を定量的かつ詳細に測定することができる。しかしながら、電極の調製およびその操作などに熟練した技術を要し、一つの試料の測定に多くの時間を要するので大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングするには適していない。また、細胞に傷害を与えやすいという側面もある。

【0005】

高速の薬品スクリーニングの用途、特にファーストスクリーニング（第一候補の絞り込み）の用途には、必ずしも電極刺入法に見られるイオンチャンネルの定量的測定は必要なく、イオンチャンネルの開閉の定性的検出で十分であり、測定の迅速性、簡便性がより重視されるため、このような用途には、平板電極を使った細胞外電位記録法が適していると考えられる（例えば、特許文献1、2、3、4、5参照）。

【0006】

平板電極を使った細胞外電位記録法は、生体内塩濃度組成に近い溶液中で生体試料を平板電極上に配置し、その電極の電位変化を測定することによりイオンチャンネルを通過するイオン流を測定できるということを利用したものである。すなわち、細胞の電気生理的活動は、その近傍に配置された電極電位に変化をもたらすということを利用したものである。

【0007】

上記細胞外電位記録法は、細胞を平板電極上に配置しただけで、細胞内に電極を刺入する必要等がないので、簡便かつ迅速に細胞の電気生理的活動を測定することができる。したがって、薬品的高速スクリーニング等に適している。

【0008】

しかしながら、細胞の電気生理的活動に起因する電気信号の変化は非常に微弱であり、平板電極を用いた細胞外電位記録法においては、かかる信号の変化を溶液を介して検出することになるためさらに微弱化する。したがって、精度の高い測定を行うためには、細胞の電気生理的活動に起因する電気信号の変化を感度良く検出する必要がある。

【0009】

しかも、単離した細胞は、通常長径 $10 \sim 30 \mu\text{m}$ と非常に小さいため、平板電極を用いた細胞外電位記録法において、単離した細胞を測定するために、直径 $5 \sim 100 \mu\text{m}$ の微小な電極が用いられることになる。このような微小金属電極のインピーダンスは $80 \text{ M}\Omega$ から $32 \text{ G}\Omega$ （印加周波数 1 Hz 時）と、特に低周波領域で非常に高いため、外部雑音の影響を受けやすくまた細胞の電気生理的活

動に起因する低周波領域の電気信号は急激に減衰してしまう。

【0010】

平板電極のインピーダンスを低減させる方法として、電解メッキにより電極表面に白金黒を堆積させる方法が好適に用いられている（例えば、特許文献6参照）。白金黒を、多孔性構造を有するように電極上に堆積させることにより、電極表面を粗面化し、電極の見かけ上の面積を増大させ、電極インピーダンスを低減させることによる。しかしながら、かかる方法は、測定対象として細胞を用いる場合には、以下に示す不都合がある。

【0011】

測定の際に、細胞を電極表面に固定化することが感度の点から望ましいが、一般に、細胞の固定化には、固定化する面が細胞の大きさに対し十分に平坦であること、高生体親和性を持つことが要求される。しかしながら、電解メッキによって形成させた白金黒は、平板電極上に隆起して堆積し、その電極上の隆起が細胞に対して無視できない高さとなり、結果として、単離細胞を電極表面に固定化することが困難となる。

【0012】

また、細胞の固定化を容易にするため、平板の電極近傍もしくは電極内に貫通孔を設け、貫通孔により細胞を補足する方法が知られている。しかしながら、この方法に上記白金黒を堆積させる方法を適用すると、貫通孔が塞がれてしまう場合がある。したがって、この場合も、貫通孔の機能が妨げられ、細胞の固定化は困難となる。

【0013】

【特許文献1】

特許公報第2949845号

【特許文献2】

米国特許第580725号

【特許文献3】

米国特許第5563067号

【特許文献4】

特開平 9-827318 号

【特許文献 5】

米国特許第 5187069 号

【特許文献 6】

特開平 6-78889 号

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記の問題点を解決するものであって、平板電極における電極表面の平坦性を保ったまま、電極のインピーダンスを低減することにより、生体試料の電気生理的活動に起因する微小な電気信号の変化を高感度に検出する一体型複合電極を提供することを目的とする。また、貫通孔を設けた平板電極においても、貫通孔の機能を妨げることなく、電極のインピーダンスを低減することにより、生体試料の電気生理的活動に起因する微小な電気信号の変化を高感度に検出する一体型複合電極を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、一体型複合電極の作製において、電極表面を誘電体材料で被覆することにより、電極インピーダンス（特に電極の溶液との界面に生ずる電気二重層に起因するインピーダンス）を低減させることができること、および誘電体材料の被覆により細胞等の生体試料の電極表面への固定化の妨げとなる電極表面の粗面化は生じないこと、また誘電体材料の種類によっては、生体試料の固定化を容易及び／又は強固にすることを発見した。本発明は、これらの知見に基づいて完成された。

【0016】

本発明は、生体試料の電気生理的变化に起因する電気信号を検出するための一体型複合電極であって、基板上に配置された少なくとも一つの電極と、該電極からの電気信号を導出し得る配線部とを備え、該電極は、その表面が誘電体材料で被覆されていることを特徴とする一体型複合電極を提供する。本発明に用いられる生体試料として、細胞、細胞小器官、タンパク質、核酸、リン脂質等が挙げら

れる。

【0017】

好ましくは、前記生体試料が細胞である。

【0018】

好ましくは、前記誘電体材料が強塩基性官能基もしくは強酸性官能基を持つ高分子材料である。

【0019】

好ましくは、前記高分子材料が、ポリエチレンイミン、ポリオルニチン、ポリリジンからなる群から選ばれる正荷電性ポリマーである。

【0020】

好ましくは、前記高分子材料が、ビグアニド基、もしくはカルバモイルグアニド基を持つ高分子である。

【0021】

好ましくは、前記電極が白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウム、銀、タンゲステン、ITOおよびこれらの組み合わせからなる群から選ばれる素材から形成される。

【0022】

好ましくは、前記誘電体材料で被覆された電極の表面に、さらに生体試料の固定化を容易及び／又は強固にする固定化材が被覆されている。

【0023】

好ましくは、前記固定化材が細胞接着性のたん白質である。

【0024】

好ましくは、前記電極は、0.1M電解質溶液との界面の電気二重層容量が、印加電圧0Vにおいて、 $27\mu\text{F}/\text{cm}^2$ 以上である。

【0025】

好ましくは、前記電極が、基板に形成された貫通孔の孔内に、又は、さらに基板表面において前記貫通孔の孔周囲を包囲するように形成されている。

【0026】

【発明の実施の形態】

以下、図面を用いて本発明をより詳細に説明する。

【0027】

第1の実施形態

本実施形態は、本発明の細胞の電気生理的变化に起因する電気信号検出用の一体型複合電極（以下においては、センサ基板ともいう）を備えた細胞外電位測定装置に係るものである。図1は、本実施形態の細胞外電位測定装置の細胞固定化器19の構造を模式的に示す部分断面図である。図2は図1のA-A断面から下方向を見た図である。ただし、図1は細胞固定化器19に細胞6が固定化されている状態を示すが、図2は細胞6を省略して示す。また、図2において、センサ基板16の裏面に形成されているリード線9を点線で示す。

【0028】

細胞固定化器19は電極11を備えたセンサ基板16及び溶液保持部17とからなる。センサ基板16は、基板1上に電極11及びリード線9が形成された構成である。電極11はその表面が誘電体材料12で被覆されており、リード線9は外部接続部10を除いてその表面が絶縁層3で被覆されている。好ましくは、さらにリード線9の外部接続部10は、被覆層21でコートされ、耐久性を有する構成とする。被覆層21は、外部接続部10が曝される周囲の雰囲気に応じて、かかる雰囲気に対して耐性の強い材料を選択するようにする。

【0029】

基板1材料としては、単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表される半導体材料およびシリコン・オン・インシュレータ（SOI）などに代表されるこれら半導体材料の複合素材、もしくは、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスファイト、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素の群から選ばれる無機絶縁材料、もしくは、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート（PET）、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート（PC）、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹

脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホン等の群から選ばれる有機材料が挙げられる。好適に用いられる材料は、単結晶シリコン、SOI、PET、PCである。

【0030】

電極11には、白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウム、銀、タンゲステンの群から選ばれる金属材料が好適に用いられる。これらの材料を層状に堆積させてもよい。または、電極11の材料として、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガン、酸化鉛、ITO（インジウム錫酸化物）の群から選ばれる金属酸化物材料を用いることもできる。電極11は、さらに導電性高分子によって被覆しても良く、また、単分子膜によって被覆してよい。電極11に接続するリード線9にも、上記と同様の電極材料が適用できる。

【0031】

次に、センサ基板16の作製方法の一例を示す。まず、上記電極材料を上記基板材料からなる基板1上に蒸着した後、フォトレジストを用いてエッチングすることにより、電極11、および対応するリード線9を1セットとしてかかるセットを複数セット有する所望のパターンを形成する。なお、電極11のパターン形成は、その他に、予め電極パターンを形成させたステンシルマスクを通じて蒸着するマスク法や、リフトオフ法も適応できる。その後、外部接続部10を除くリード線9部分を絶縁層3で被覆した後、ダイシングし、所定角の小片に切り出し、一つの小片を上記センサ基板16とする。一つの小片には、電極11及びリード線9が1セット形成されているようにする。

【0032】

上記所望のパターンは、各小片の略中心に一つの電極11が形成されるものとし、電極11の形状は、代表的には正方形もしくは円形であって、例えば、1辺の長さ、もしくは直径を約1～2000 μ mの範囲に形成し得る。電極の大きさが生体試料より大きい場合、一つの電極により複数の生体試料の測定が可能となる。

【0033】

一つの細胞の電気生理的活動を測定するためのセンサ基板 16 においては、測定対象の細胞の大きさによるが、例えば測定対象が長径略 $15\ \mu\text{m}$ の細胞である場合には、直径略 $5\ \mu\text{m}$ の円形の電極 11 が好ましい。この場合、電極 11 上に一つの細胞のみを固定化することが容易となり、一つの細胞の電気生理的变化に起因する電気信号を容易に測定することができるからである。

【0034】

誘電体材料 12 としては、強塩基性もしくは強酸性官能基を持つ高分子が好適に用いられる。具体的には、ポリエチレンイミン (PEI)、ポリオルニチン (PO)、ポリリジン (PL) 等の正荷電性ポリマーが好適に用いられる。正に荷電したこれらのポリマーは、負に荷電した細胞を引き付ける効果も併せ持つ。同様に、誘電体材料 12 として用いられ、細胞接着能を併せ持つ材料は、ビグアニド基、もしくはカルバモイルグアニジド基を持つ高分子が上げられる。具体的にはアリルビグアニド-*c o*-アリルアミン (PAB)、アリル-N-カルバモイルグアニジド-*c o*-アリルアミン (PAC) が好適に用いられる。

【0035】

誘電体材料 12 による電極の被覆は、細胞の大きさに対する電極 11 表面の平坦性に影響を与えることはない。従って、細胞の固定化の妨げとはならない。

【0036】

誘電体材料 12 の電極 11 への被覆は、誘電体材料 12 を所定の濃度で溶解させた誘電体溶液を、電極 11 上に曝し、所定時間経過後、電極 11 の表面から誘電体溶液を取り除き、表面を洗浄液で少なくとも 1 回以上洗浄し、乾燥することにより行うことができる。または、上記誘電体溶液を、電極 11 の上面だけにスポットし、被覆する方法であってもよい。

【0037】

誘電体材料 12 の被覆条件等により、電極のインピーダンスは異なるが、本発明のように誘電体材料 12 で被覆がされている電極は、被覆がされていない電極と比較すると、そのインピーダンスが小さくなる。電極のインピーダンスに寄与するインピーダンスの一つとして、電極の溶液との界面の電気二重層容量によるインピーダンスがあるが、かかる電気二重層容量が、印加電圧 0 V であり、電解

質濃度が0.1Mにおいて、好ましくは $25\mu\text{F}/\text{cm}^2$ 以上、より好ましくは $27\mu\text{F}/\text{cm}^2$ 以上となるように電極の被覆を行うことが好ましい。ただし、被覆していない電極より電気二重層容量が大きくなる場合は、本発明による効果が得られるといえる。

【0038】

リード線9を被覆し絶縁するための絶縁層3の材料としては、ポリイミド(P I)樹脂、エポキシ樹脂などの樹脂が挙げられる。ネガティブフォトセンシティブポリイミド(N P I)などの感光性樹脂が好ましい。感光性樹脂の材料を用いると、例えば、フォトエッチングによるパターン形成を利用して、電極11上の絶縁層3部分に孔を開けて、該電極11のみを露出させることが可能となる。このように、絶縁層3は、各電極11上及びリード線9の外部接続部10を除いて、基板1のほぼ全面を被覆するように設けられることが、生産効率などの点で好ましい。

【0039】

上記センサ基板16は、細胞外電位測定装置におけるものであり、センサ基板16上での細胞培養を容易にするための構造が加えられており、一体化細胞固定化器19として提供されるものである。

【0040】

細胞固定化器19においては、センサ基板16上での細胞培養のために、センサ基板16上に、絶縁層3を介して培養液5を保持し得る溶液保持部17が構成されている。図1では、円筒状の枠4をセンサ基板16上に設置することにより溶液保持部17を構成している。枠4は、例えばアクリルを用いて作製し得る。枠4の内側が、細胞培養領域となる。

【0041】

次に、電極11上への細胞の固定化工程の一例を示す。まず、センサ基板16最表面のうち枠4内の領域に固定化材(図示せず)を固定化することが好ましい。本明細書において、固定化材とは、細胞の固定化を容易及び/又は強固にする材料のことをいう。固定化材の固定化は任意であり、また誘電体材料が、固定化材の機能を有する場合もあるが、かかる場合であっても固定化材を用いることに

より、さらに細胞の固定化を容易及び／又は強固にすることが可能となる。固定化材の固定化は、枠 4 を設置する前に行ってもよい。

【0042】

固定化材として、マトリクス材料を用いることができる。マトリクス材料として、細胞接着性のタンパク質が好適に用いられ、かかるタンパク質としてはコラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン等が挙げられる。

【0043】

次に、溶液保持部 17 内に培養液 5 を満たす。培養液 5 としては、20 mM～400 mM の塩化ナトリウムを主成分とする生理食塩水溶液、および種々の栄養素、成長因子、抗生物質などを含有する培地、所定の化学物質、化合物、薬剤を溶解させた緩衝溶液などが好適に用いられる。

【0044】

その後、培養液 5 内に、所望の細胞を播種する。細胞の培養が進行すると同時に、付着性細胞が、固定化材が固定化されている場合はこれを介して、センサ基板 16 最表面に固定化される。

【0045】

細胞固定化器 19 においては、図 1 に示すように参照電極 13 が設置され、電極 11 からの電気信号は、参照電極 13 の電位を基準として測定される。通常、参照電極 13 は、その表面積が電極 11 の表面積以上であり、好ましくは電極 11 の表面積より大きく、金、白金、銀—塩化銀などの材料で作製されたものであるが、任意の大きさ及び形状であり得る。また、参照電極 13 は、培養液 5 に浸漬していればよく、図示しないが枠 4 の内壁に取り付けられているものであってもよい。

【0046】

以上、図 1、図 2 を用いてセンサ基板 16 上に一つの電極 11 のみが形成されている細胞固定化器 19 を示したが、図 3 に示すように、センサ基板 16 上に複数の電極 11 とこれに対応するリード線 9 が形成されているものであってもよい。図 3 は、細胞固定化器 19 の構成を示す特定断面から下方方向を見た図であり、かかる特定断面は図 2 における断面と同一である。図 3 は、6 行 6 列の格子状の

各交点に電極 11 が配置されている構成である。尚、図 3 は、枠 4 を省略して示す。図 3 に示す構成において、枠 4 は各電極 11 毎に設置する構成、複数の電極 11 毎に設置する構成いずれであってもよい。各電極 11 毎に枠 4 を設置する構成は、例えば各電極 11 上に固定された細胞の薬品応答性を測定する際に有用であり、複数電極 11 毎に枠 4 を設置する構成は、例えば各電極 11 上に固定化した神経細胞間でネットワークを形成させることができ、ネットワークに関する解析を行う際に有用である。

【0047】

細胞固定化器 19 は、特に複雑な装置を必要とせず、一对の電極 11、13 からの信号を検出し得る検出装置とつなぐことによって、細胞外電位測定装置を構成し得るものである。かかる細胞外電位測定装置においては、細胞の細胞膜電位または細胞膜電位の変化を、細胞外電位変化による電圧の変化として測定し得る。

【0048】

また、細胞固定化器 19 は、配線を介して刺激信号付与装置および出力信号処理装置と組み合わせることにより、電極 11 上に固定化された細胞に電氣的刺激を与え、その応答としての出力信号を処理する図 4 に示すような細胞外電位測定装置 40 として提供され得る。図 4 は、細胞外電位測定装置 40 の概略を示す構成図である。

【0049】

細胞外電位測定装置 40 において、出力信号処理装置は、適切な測定用ソフトウェアを備えたコンピュータ 39 によって一体として構成される。刺激信号付与装置 34 から配線 37 を通して印加する刺激信号は、刺激信号付与装置 34 で刺激条件が設定される。もしくは、適切な測定用ソフトウェアを備えたコンピュータ 39 によって刺激条件が設定される。測定用ソフトウェアは、コンピュータの画面上に、刺激条件などを設定し得るパラメータ設定画面、細胞から検出された電位変化を記録し、リアルタイムで表示し得る記録画面、および記録されたデータを解析し得るデータ解析画面などを与える。好ましくはコンピュータ 39 からの刺激信号は、D/A 変換器を介して電極 11 へと出力され、そして細胞からの

出力信号は、信号増幅装置 33 によって増幅され、周波数帯域を制限された後、A/D変換器を介してコンピュータに入力される。配線 37 は、刺激信号付与用のものであり、配線 32 は、出力信号検出用のものである。

【0050】

さらに、細胞外電位測定装置 40 は、細胞固定化器 19 に設けられている電極 11 を撮像もしくは観察する撮像装置 35、細胞固定化器 19 を所定の温度、ガス濃度、湿度に保つための測定環境調節装置 36、細胞固定化器 19 内の培養液 5 を、所望の量で所望の化学成分の溶液に置換できるように注入もしくは排出する溶液駆動装置 38 等を備えるものであってもよい。

【0051】

細胞外電位測定装置 40 は、刺激信号付与装置から刺激信号を与えることなく細胞において発生する自発電位のみの測定も行うことができるものである。

【0052】

第2の実施形態

本実施形態は、第1の実施形態とは異なる構成のセンサ基板 16 を備えた細胞外電位測定装置にかかるものである。図5は、本実施形態の細胞外電位測定装置の細胞固定化器 19 の構造を模式的に示す断面図である。図6は図5のB-B断面から下方向を見た図である。ただし、図5は細胞固定化器 19 に細胞 6 が固定化されている状態を示すが、図6は細胞 6 を省略して示す。また、図6において、センサ基板 16 の裏面に形成されているリード線 9 を点線で示す。

【0053】

本実施形態の細胞固定化器 19 は、図1に示すものとは、センサ基板 16 の構成が異なるのみであるので、センサ基板 16 以外の構成の説明は省略する。

【0054】

センサ基板 16 は貫通孔 14 を有する。貫通孔 14 により、生体試料が密着して保持される。貫通孔 14 の形状は、目的の生体試料が保持されるものであれば特に制限されない。図5においては、上面開口部が下面開口部より大きい円筒状の貫通孔 14 とする。貫通孔 14 のサイズは、目的の生体試料に依存した任意の大きさを採用し得、目的の生体試料が保持される大きさであれば特に制限されな

いが、代表的にはセンサ基板 16 上面での開口部の直径が $10 \sim 500 \mu\text{m}$ の範囲にあり、通常は直径が $10 \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲にあり、好適な例示としては生体試料として用いる細胞の長径が略 $30 \mu\text{m}$ の場合、直径が略 $20 \mu\text{m}$ である。

【0055】

貫通孔 14 の形成方法は、基板 1 材料によって異なるが、例えば基板 1 が PET である場合には、エキシマレーザを用いて形成することができる。また、例えば基板 1 が Si ウェハである場合には、エッチングにより形成することができる。

【0056】

さらに、貫通孔 14 を下方から細胞吸引手段に連結することにより、貫通孔 14 における細胞の保持をより強固なものとすることができ、浮遊性の細胞であっても貫通孔 14 に保持することができる。

【0057】

センサ基板 16 において、貫通孔 14 の孔壁面 14a、又は、さらに孔の開口部周縁 14b に、電極 11 が形成されている。電極 11 は誘電体材料 12 で被覆されている。電極 11 は、真空蒸着法あるいはスパッタ法を用いて電極材料を貫通孔 14 の孔壁面 14a および開口部周縁 14b に付着させることにより形成する。電極 11 の誘電体材料 12 による被覆は、第 1 の実施形態と同様の方法を採用し得る。

【0058】

誘電体材料 12 により電極 11 を被覆しても貫通孔 14 を塞ぐことにはならず、また細胞の大きさに対し電極 11 表面は十分に平坦であるといえる。したがって、細胞 6 の固定化の妨げとはならない。また、電極の溶液との界面の電気二重層容量が、好ましくは $25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 以上、より好ましくは $27 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 以上となるように電極の被覆を行うことが好ましいのは、第 1 の実施形態と同様である。

【0059】

センサ基板 16 の裏面には、電極 11 に接続するようにリード線 9 が形成されている。

【0060】

以上、図5、図6を用いてセンサ基板16上に一つの電極11のみが形成されている細胞固定化器19を示したが、図7に示すように、センサ基板16上に複数の電極11とこれに対応するリード線9が形成されているものであってもよいのは、第1の実施形態と同様である。図7は、細胞固定化器19の構成を示す特定断面から下方向を見た図であり、かかる特定断面は図6におけるものと同一である。図7は、6行6列の格子状の各交点に電極11が配置されている構成である。図7は、枠4を省略して示す。尚、本実施形態のセンサ基板16においては、表面に配線が形成されていないので、センサ基板16と枠4とは必ずしも別構成である必要はなく、一体で形成することも可能である。

図8は、本実施形態のセンサ基板16の改変例を示す断面図である。貫通孔14の形状は、図5に示す円筒状には限定されず、他の例として、図8に示すような形状であってもよい。例えば、基板1の厚みの都合上、連続的な円筒状の貫通孔14の作製が困難である場合に、上面及び下面より窪み15a、15bを形成してこれらの窪み15a、15bを一体として図8に示すような貫通孔14を形成することができる。

【0061】

図9は、本実施形態のセンサ基板16の他の改変例を示す断面図である。図10は図9のC-C断面から下方向を見た図である。ただし、図9は細胞固定化器19に細胞6が固定化されている状態を示すが、図10は細胞6を省略して示す。また、図10はセンサ基板16の裏面に形成されているリード線9を点線で示す。図9、図10に示すセンサ基板16は、図5に示すものと同様の貫通孔14（図9、図10において、誘電体材料による電極11の被覆等は省略する）が一つの電極11に対して複数形成されている構成を有する。貫通孔14の数及び位置関係は任意である。位置関係は、例えば図示したように放射状とし得る。本改変例においては、複数の貫通孔14に保持された細胞6に起因する電気信号が一つの電気信号として一つの電極11から検出されることになる。本改変例は、複数の細胞の応答を同時に検出する薬品スクリーニング等において有用である。

【0062】

図9、図10を用いてセンサ基板16上に一つの電極11のみが形成されている細胞固定化器19を示したが、図11に示すように、センサ基板16上に複数の電極11とこれに対応するリード線9が形成されているものであってもよいのは、第1の実施形態と同様である。図11は、細胞固定化器19の構成を示す特定断面から下方向を見た図であり、かかる特定断面は図10における断面と同一である。図11は、6行6列の格子状の各交点に電極11が配置されている構成である。図11は、枠4を省略して示す。

【0063】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。これらの実施例は、本発明を限定するものではない。

【0064】

実施例1

本発明に係る図9に示す構成のセンサ基板（実施例1）と、電極を誘電体材料で被覆していないセンサ基板（比較例1）とを作製し、電極の特性を調べる実験を行った。

【0065】

基板1として100mm角、厚さ25 μ mのPETフィルムを、電極11及びリード線9の材料として金を用いた。PETフィルム上に、パルス発振させたエキシマレーザを用いて、貫通孔14を形成した。貫通孔14は、一つの領域に100個となるようにして、複数領域に形成した。一つの領域内の貫通孔14は放射状に形成した。各貫通孔は、表面開口部の直径が20 μ m、裏面開口部の直径が5 μ mの円筒形状とした。一つの領域は、直径1mmの円に含まれる大きさとした。尚、各領域間は、後の工程における小片の切り出しを容易とするために、隣接する領域間は左右間隔が3mm、上下間隔が10mmとなるようにした。

【0066】

そして、直径1mmの円状開口部を複数含み、上記フィルム上の各領域に各開口部に対応するステンスルマスクを通じて、電極材料である金を厚さ200Åにスパッタした。その後、フィルム裏面に同様の方法で、リード線形状をスパッタ

した。これにより、フィルム表面の直径 1 mm の範囲及び貫通孔内壁に形成された電極 11 は、裏面に形成されたリード線 9 に接続された。その後、100 mm 角の PET フィルムを一つの小片が一つの領域を含むように切り出した。切り出した小片についてフィルム表面に形成された電極 11 表面からリード線 9 への導通を確認した。一つの小片を比較例 1 のセンサ基板とした。

【0067】

実施例 1 のセンサ基板に関しては、さらに以下の処理を施した。pH 8.4 のホウ酸緩衝液に終濃度 0.1 重量% となるように PEI を希釈した誘電体溶液を、センサ基板上に 16 時間曝し、その後誘電体溶液を取り除いた。そして、センサ基板表面を滅菌水で十分にリンスした。このように作製したものを、実施例 1 のセンサ基板とした。

【0068】

上記実施例 1 および比較例 1 のセンサ基板上の電極に関し、センサ基板を用いて細胞固定化器を作製し、電気生理的測定を行った。電気生理的測定は、基準電極として白金電極を用い、溶液保持部には 0.1 M の塩化ナトリウム水溶液を満たし、実施例 1 および比較例 1 のセンサ基板上の電極を測定電極として、電気化学測定システム HC3000（北斗電工社製）を用いて、周波数を 1 Hz から 20 kHz まで連続的に変化させて正弦波電圧を電極間に印加し、インピーダンスを測定した。バイアス電圧は 0 V とし、印加電圧の振幅は 50 mV とした。図 12 に測定結果を示す。図 12 に示されるように、実施例 1 と比較例 1 では、インピーダンスに顕著な違いが見られる。周波数が 3 kHz 以下では、実施例 1 のインピーダンスは、比較例 1 のインピーダンスより小さく、かかる傾向は印加周波数が低い程顕著であり、周波数が 20 Hz 以下の低周波印加領域では、10 分の 1 以下であった。

【0069】

本測定におけるインピーダンスは、測定電極と溶液との界面及び基準電極と溶液との界面に形成される容量、溶液抵抗、電極表面抵抗、回路抵抗等さまざまなものの合成インピーダンスである。しかしながら、図 12 の測定結果からは、実施例 1 と比較例 1 とのインピーダンスの違いには、周波数依存性があることがわ

かる。したがって、

両者のインピーダンスの違いは、周波数依存性がある測定電極と溶液との界面に形成される容量によるものであることがわかる。尚、基準電極と溶液との界面に形成される容量によるインピーダンスにも周波数依存性があるが、基準電極の構成に関し、両者に差異はないため、かかるインピーダンスは、図12の測定結果におけるインピーダンスの差異には寄与していないと考えることができる。

【0070】

したがって、低周波領域における実施例1のインピーダンスと比較例1のインピーダンスとの比較は、測定電極界面での容量のインピーダンスの比較であるといえ、低周波領域において実施例1における測定電極界面での容量のインピーダンスは、比較例1のものと比較して10分の1以下であるといえる。

【0071】

上記インピーダンスの測定結果から、実施例1及び比較例1の測定電極界面の電気二重層容量を計算したところ、実施例1では $165 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 、比較例1では $10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ となった。電気二重層容量は印加電圧や電解質の濃度によって異なるが、上記計算値は印加電圧が印加電圧が0Vであり、電解質濃度が0.1Mにおける値である。

【0072】

実施例2

実施例1、比較例1と同様のセンサ基板を作製し、それぞれのセンサ基板に細胞接着性たん白質であるコラーゲン（Sigma P-4511）を固定化材として電極表面を含むセンサ基板上に所定の方法で1時間被覆した（37℃雰囲気下）。このように作製したセンサ基板を実施例2（PEI被覆有り）、比較例2（PEI被覆無し）のセンサ基板とした。

【0073】

それぞれのセンサ基板にアクリル製の枠を設置し、溶液保持領域を形成した後、溶液保持領域内を培養液で満たし、ラット大動脈由来平滑筋細胞VSMCs A-10（ATCC CRL-1476）を 2×10^4 細胞/mlの濃度となるように播種し、CO₂インキュベータ中で5日間培養した（37℃、5%CO₂雰囲気）。

気下)。培養液はDMEM+10%FBSを用いた。実施例2、比較例2のセンサ基板を用いて測定される電圧(基準電極及び測定電極間の電圧)をそれぞれ図13、図14に示す。横軸は時間、縦軸は電圧(すなわち細胞の活動を表す電位の強さ)を示す。図13で検出される細胞の周期的活動が、図14ではほとんど検出されない。尚、図14においても円で囲んだ箇所で周期的変化が検出されているが、図13と比較した場合、電気信号の変化は小さいものである。

【0074】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の一体型複合電極によると、電極のインピーダンスの低下により、生体試料の電気生理的活動に起因する電気信号を高感度に検出することができる。特に、低周波印加領域での電気信号の大幅な減衰を防いで、高感度な電気信号検出が可能となる。従って、本発明の一体型複合電極を用いて、高速薬品スクリーニングを行う場合には、多量の生体試料を一度に短時間で感度良く測定できるので、精度の高いスクリーニングが可能となる。

【0075】

さらに、本発明においては、電極表面を誘電体材料で被覆するが、電極表面の平坦性は保たれるため、生体試料として細胞を用いる場合であっても、その固定化を妨げることはない。逆に、誘電体材料として、生体試料を引きつける作用を有するものを用いることにより、生体試料の固定化を容易及び／又は強固にすることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 第1の実施形態の細胞外電位測定装置を模式的に示す部分断面図。

【図2】 図1のA-A断面から下方向を見た図。

【図3】 第1の実施形態のセンサ基板の改変例を示す特定断面から下方向を見た図。

【図4】 第1の実施形態の細胞外電位測定装置の構成を示す概略図。

【図5】 第2の実施形態の細胞外電位測定装置を模式的に示す部分断面図。

【図 6】 図 5 の B-B 断面から下方向を見た図。

【図 7】 第 2 の実施形態のセンサ基板の改変例を示す特定断面から下方向を見た図。

【図 8】 第 2 の実施形態のセンサ基板の改変例を示す部分断面図。

【図 9】 第 2 の実施形態のセンサ基板の改変例を示す部分断面図。

【図 10】 図 9 の C-C 断面から下方向を見た図。

【図 11】 第 2 の実施形態のセンサ基板の改変例を示す特定断面から下方向を見た図。

【図 12】 印加周波数に対するインピーダンスの測定結果を示す図。

【図 13】 実施例 2 における電圧の測定結果を示す図。

【図 14】 比較例 2 における電圧の測定結果を示す図。

【符号の説明】

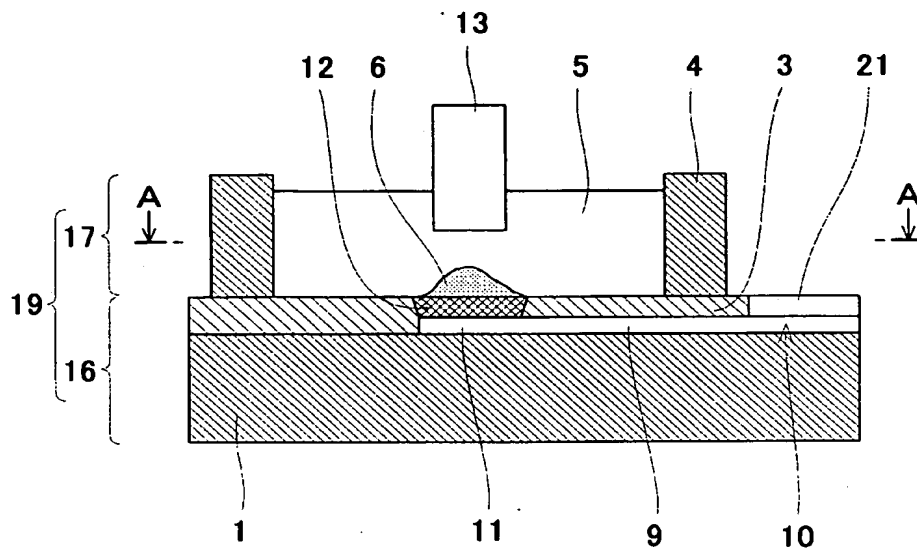
- 1 基板
- 4 枠
- 5 培養液
- 6 細胞
- 9 リード線
- 11 電極
- 12 誘電体材料
- 13 参照電極
- 14 貫通孔
- 16 センサ基板
- 17 溶液保持部
- 19 細胞固定化器
- 33 信号増幅装置
- 34 刺激信号付与装置
- 35 撮像装置
- 36 測定環境装置
- 38 溶液駆動装置

39 コンピュータ

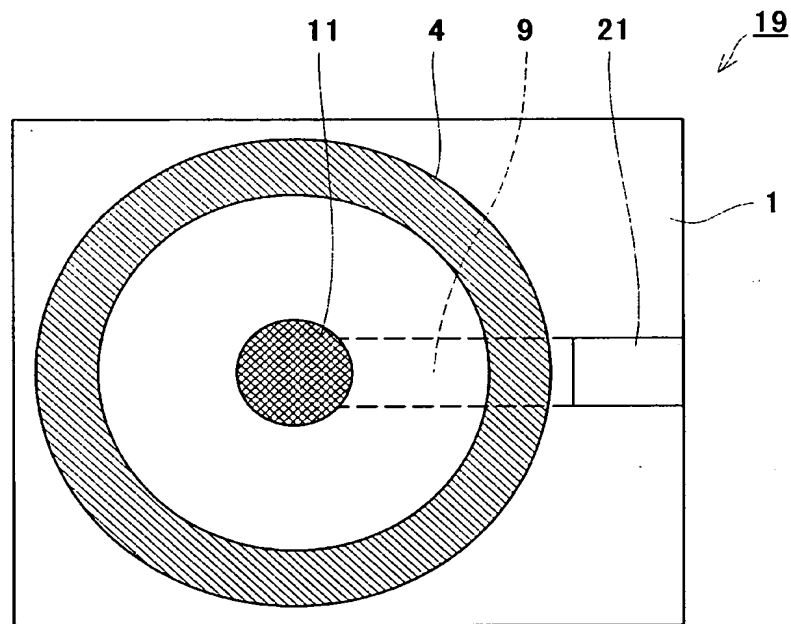
40 細胞外電位測定装置

【書類名】 図面

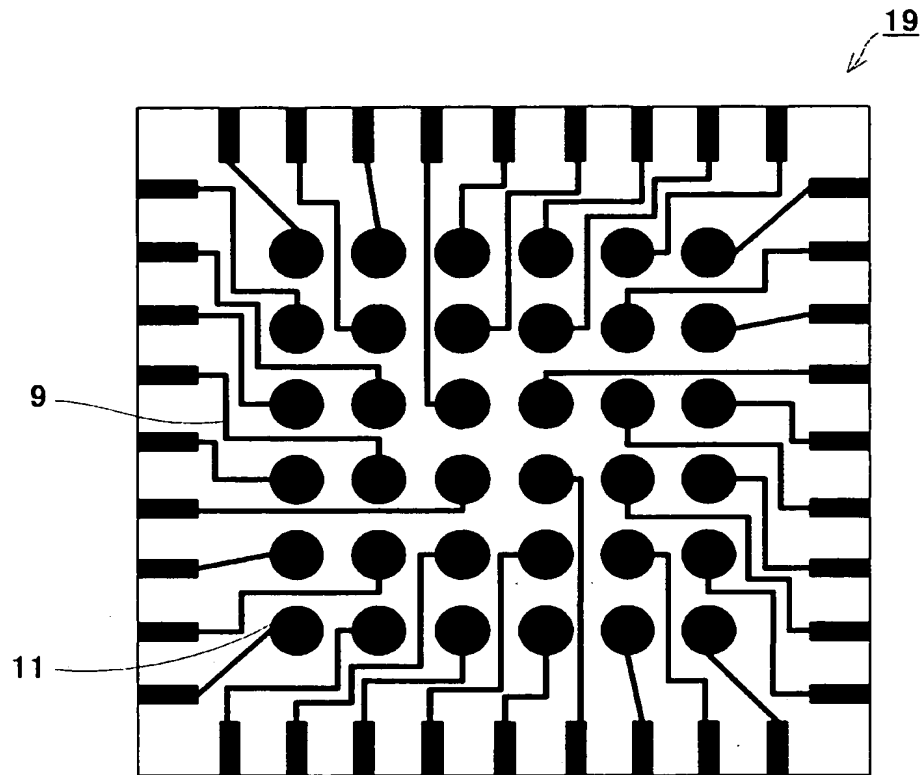
【図 1】



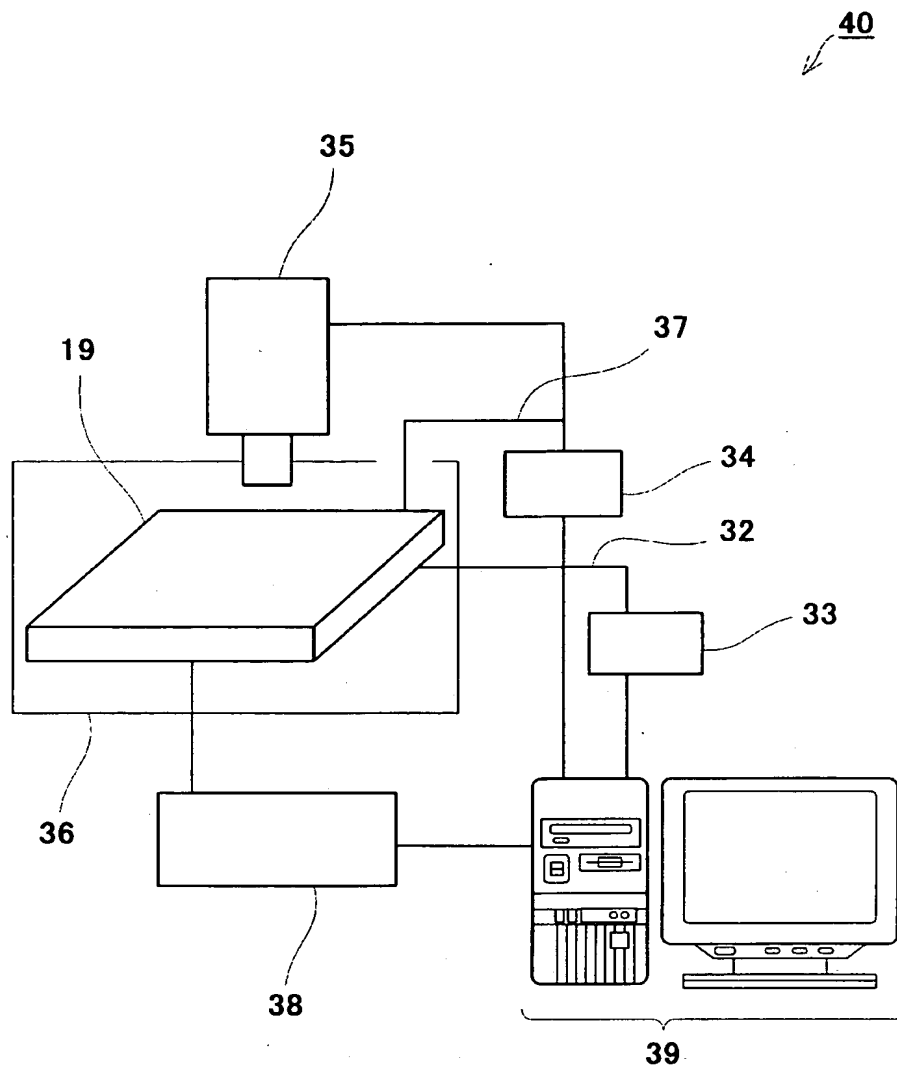
【図 2】



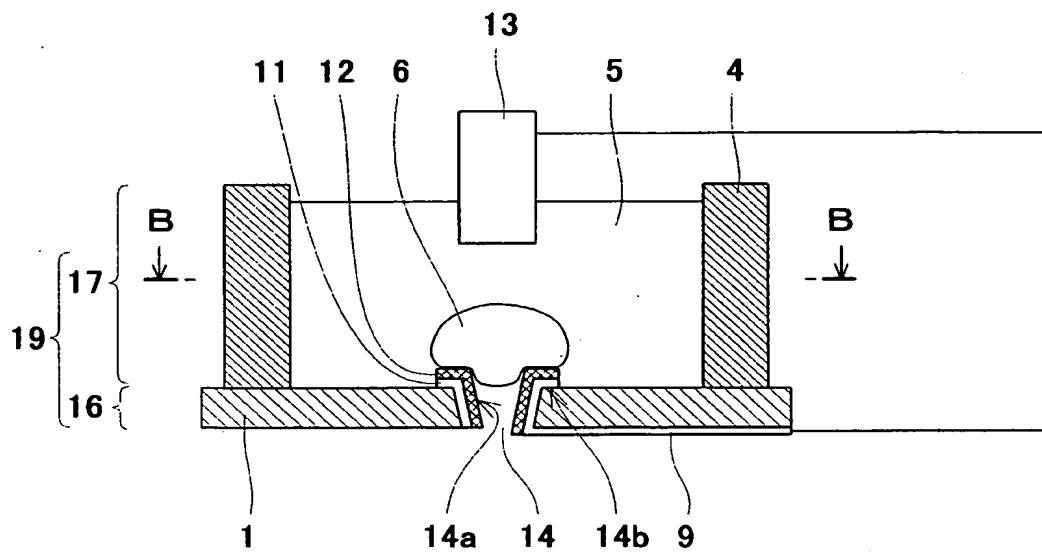
【図 3】



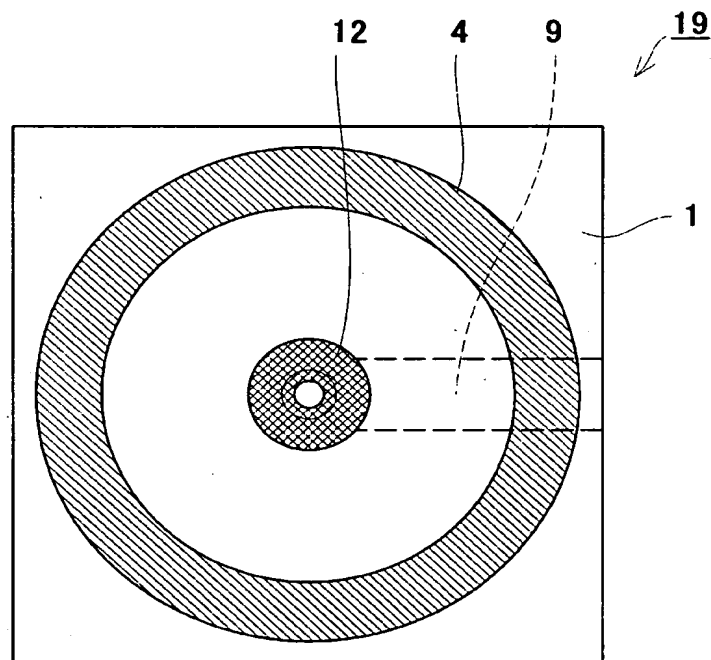
【図 4】



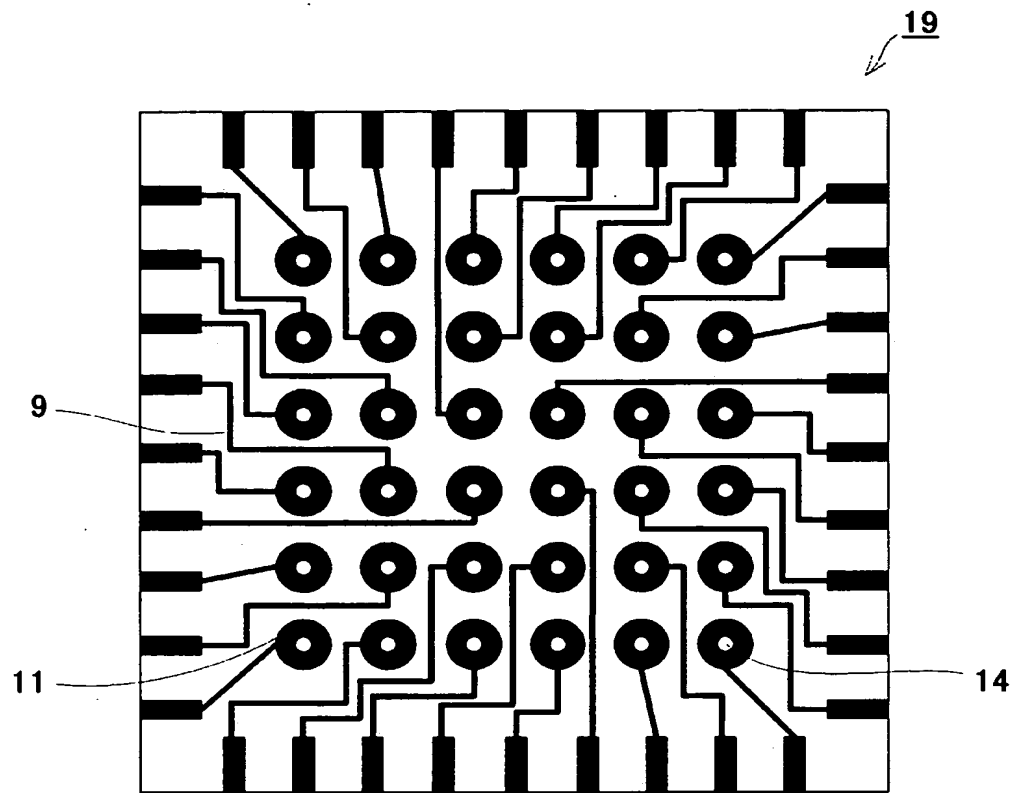
【図 5】



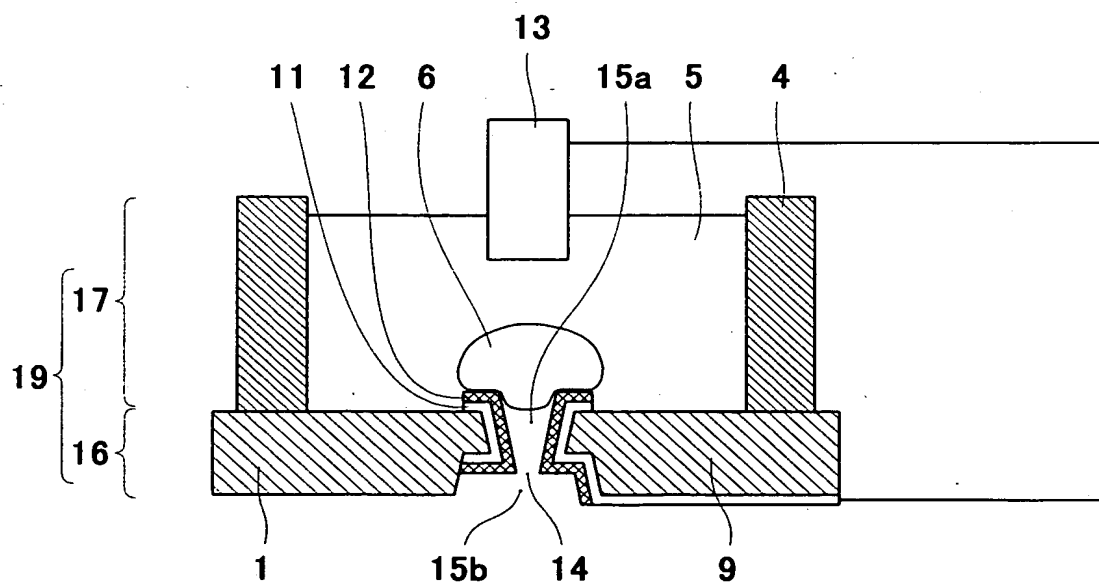
【図 6】



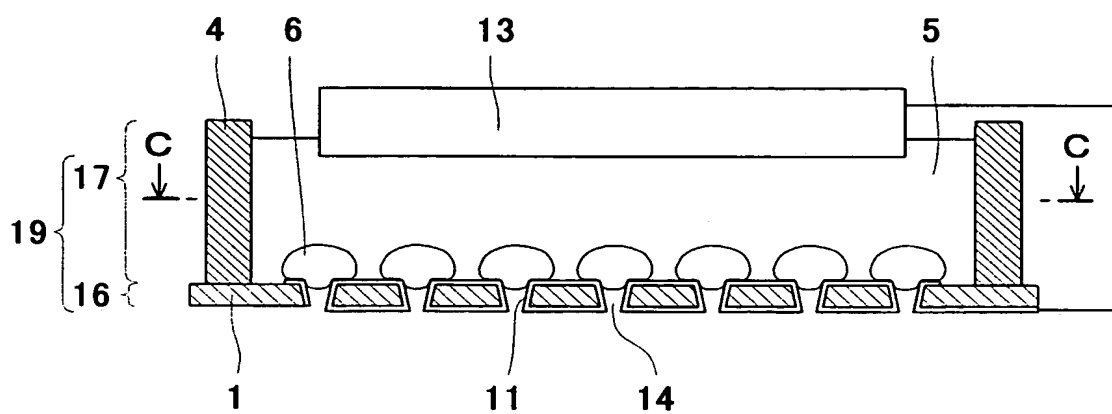
【図 7】



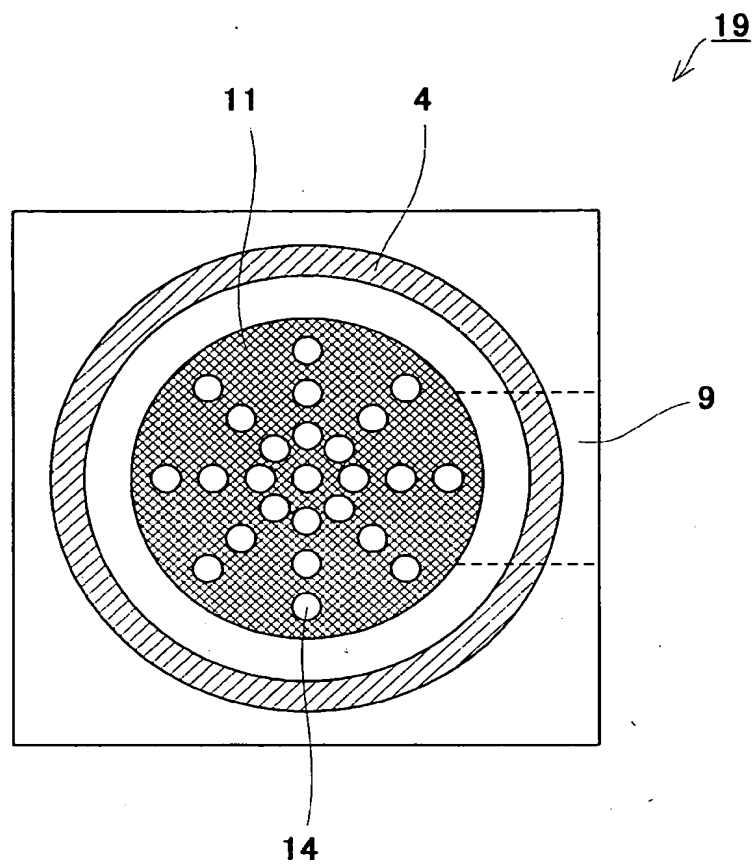
【図 8】



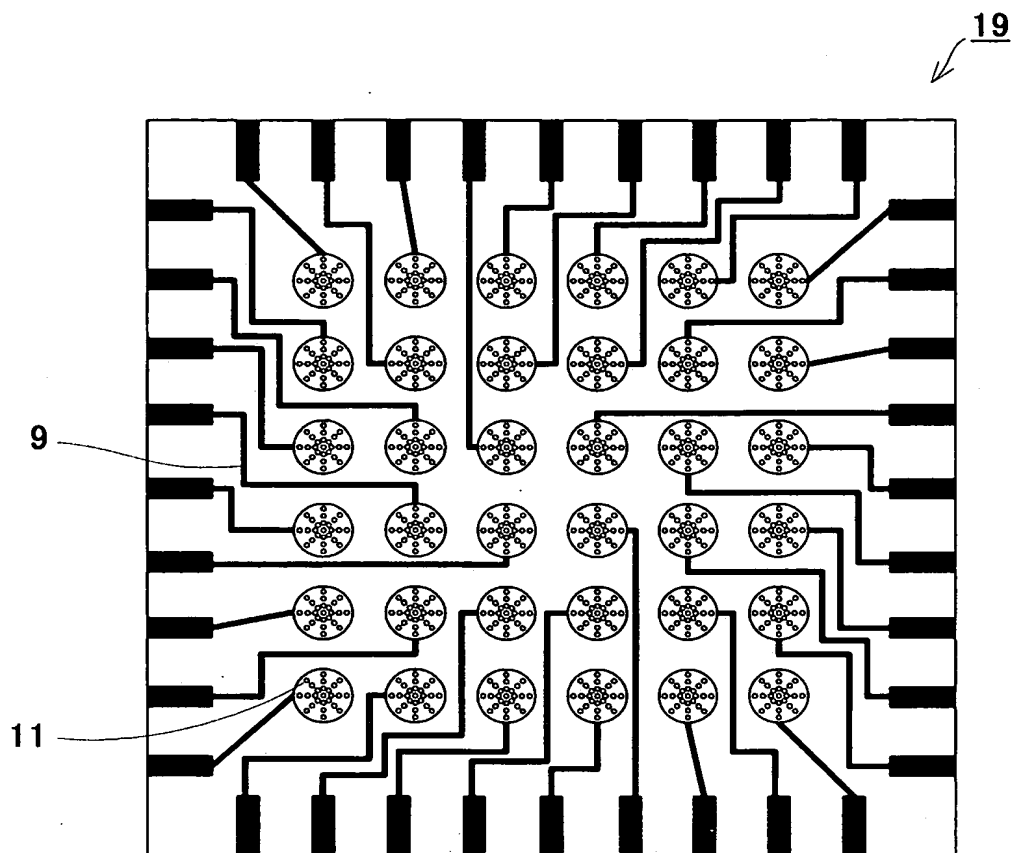
【図 9】



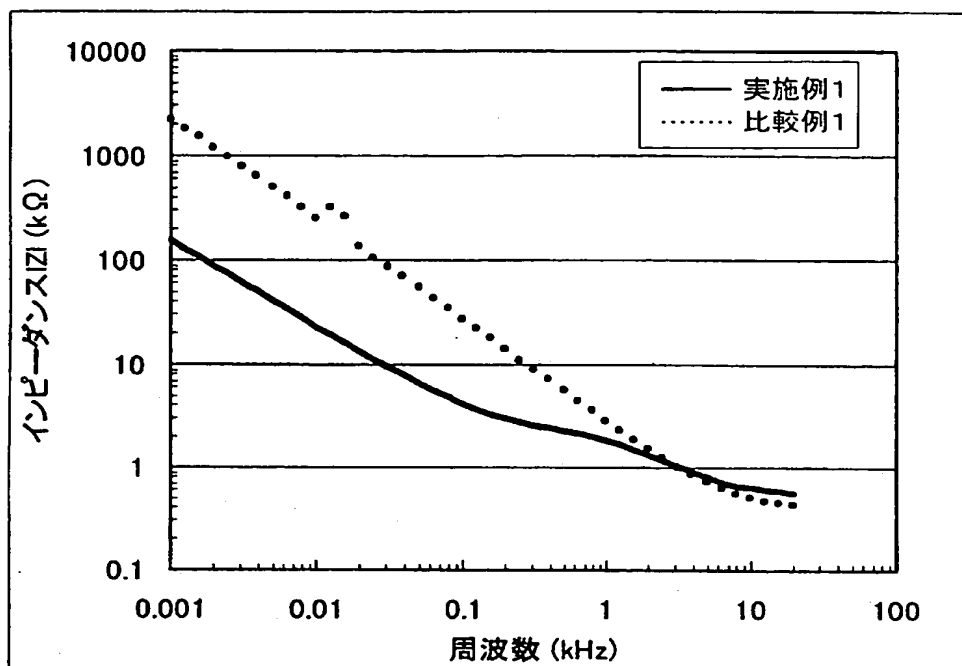
【図 10】



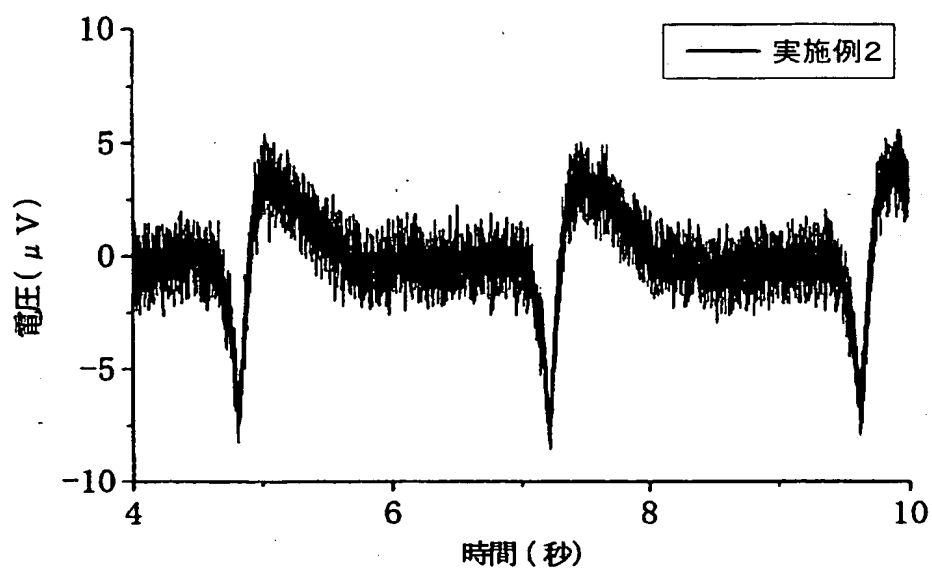
【図 11】



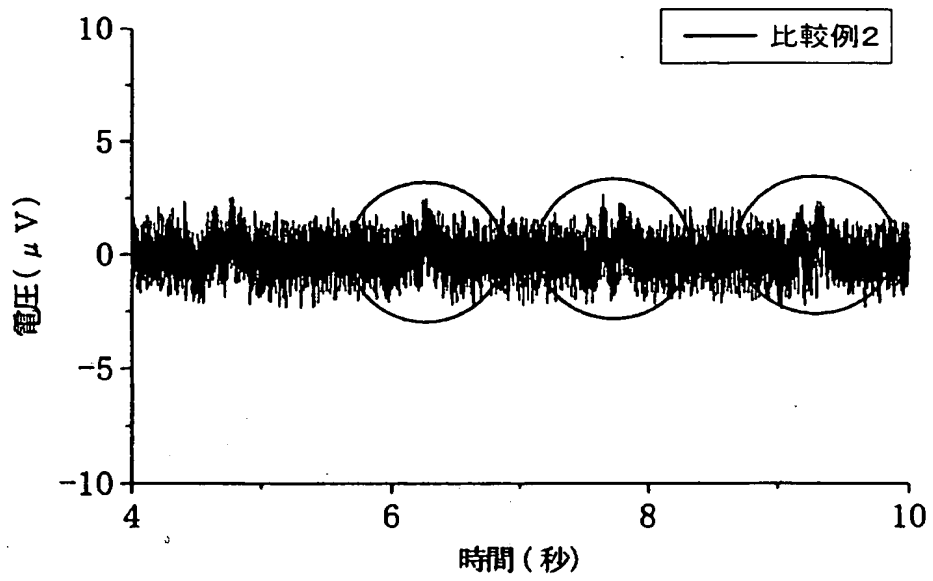
【図 12】



【図 13】



【図 14】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 平板電極における電極表面の平坦性を保ったまま、電極のインピーダンスを低減することにより、生体試料の電気生理的活動に起因する微小な電気信号の変化を高感度に検出する一体型複合電極を提供する。

【解決手段】 生体試料 6 の電気生理的变化に起因する電気信号を検出するための一体型複合電極 16 であって、基板 1 上に配置された少なくとも一つの電極 11 と、該電極 11 からの電気信号を導出し得る配線部 9 とを備え、該電極 11 は、その表面が誘電体材料 12 で被覆されている一体型複合電極 16。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号 特願 2002-313005
受付番号 50201624658
書類名 特許願
担当官 第三担当上席 0092
作成日 平成14年10月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年10月28日
【特許出願人】
【識別番号】 000005821
【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地
【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100065868
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所
【氏名又は名称】 角田 嘉宏
【選任した代理人】
【識別番号】 100088960
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所
【氏名又は名称】 高石 ▲さとる▼
【選任した代理人】
【識別番号】 100106242
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所
【氏名又は名称】 古川 安航
【選任した代理人】
【識別番号】 100110951
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所
【氏名又は名称】 西谷 俊男
【選任した代理人】
【識別番号】 100114834
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル

次頁有

認定・付加情報 (続き)

【氏名又は名称】 ル 3 階有古特許事務所
幅 慶司

次頁無

特願 2002-313005

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005821]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府門真市大字門真1006番地

氏 名

松下電器産業株式会社